

マウスおよび大腸菌の DNA と大腸菌の 2, 3 の酵素活性とに 及ぼすフロキシシン (食用赤色104号) の影響について

内田 泰・宮地 治*・松永俊一**・榎本則行***

(食品製造学教室・***食糧管理化学教室)

昭和 51 年 4 月 30 日 受理

Effect of Phloxine (Food Dye Red No. 104) on DNAs of Mouse Liver
and *E. coli* and on Some Enzyme Activities of *E. coli*

Yasushi UCHIDA, Osamu MIYACHI*, Shun-ichi MATUNAGA**
and Noriyuki ENOMOTO***

(Laboratory of Food Technology, *** Laboratory of Food Hygienic Chemistry)

Received April 30, 1976

Summary

The action of phloxine, which is used as a food additive at present in Japan, on catalase and nuclease activities and on DNA was investigated *in vivo* by using mouse and *E. coli*.

Remarkable differences of appearance were observed between phloxine-fed and non-fed mice. Phloxine remarkably depressed *E. coli* catalase activity *in vivo*. Deoxyribonuclease activity of *E. coli* was strongly enhanced but ribonuclease was inhibited by the action of the food dye.

To clarify the influence of phloxine on the physico-chemical nature of DNA *in vivo*, the ratio of enzymic decomposition of mouse and *E. coli* DNAs treated with phloxine was compared with that of untreated ones. The result of base analysis indicated that the DNA obtained from phloxine-treated organisms was similar to that from normal ones. Through the sucrose density gradient centrifugation of DNA from mouse fed with phloxine, it was confirmed that the DNA was depolymerized and that its components, particularly the very large molecules, were considerably split.

緒 言

先にわれわれは食用タール色素が, *in vitro* でタンパク質分解酵素^{1,2)}および核酸分解酵素³⁾の活性を低下させることを報告した。特にデオキシリボヌクレアーゼ (DNase) およびリボヌクレアーゼ (RNase) に対する活性阻害は, キサンテン系色素の場合が著しく高く, その際色素の構造中にハロゲン分子を含むものは阻害度が大であった⁴⁾。一般にキサンテン系色素が光化学的作用を有することはよく知られており⁵⁾, これら色素類の光化学反応はいろいろな方向から研究されている^{6,7)}。

本研究の一部は昭和 46 年度日本農芸化学会 (東京) で発表した。

* 現勤務先: エーザイ株式会社 Present address: Eizai Co., Ltd.

** 現勤務先: フナイ薬品工業株式会社 Present address: Funai Yakuhin Kogyo Co., Ltd.

食品添加物の安全性については種々の論議が行なわれており、特に食用タール色素によって着色された食品を長年にわたって摂取した場合の催腫瘍性、催変異原性などを含めた安全性への危惧の念は、なお根強く残っているのが現状であろう。

これらの観点から、キサンテン系色素の一つであるフロキシシ（赤色104号）をマウスならびに大腸菌に投与して、生体内の2、3の酵素活性および核酸に及ぼす影響を検討したのでその結果を報告する。

実 験 方 法

1. 供試色素および生物

1-1. マウスおよび飼料の調製法

用いたマウスは ddN 系で飼料および水は不断給与、給水とし、飼育は自然温度の舎内で行なった。最初の親 (P) から産れた子 (F₁) は離乳後親からはなして親と同じ飼料を与えた。このようにして第2世代目 (F₂) まで飼育した。1群の実験に用いたマウスは5匹で、各代の飼育期間は3～4カ月であった。

飼料は前報⁸⁾と同様に市販の短桿状のマウス固型飼料（オリエンタル酵母（株）製）を粉碎し、これに重量比で0.5、1.0、2.0%になるようにフロキシシ（熊谷染料（株）製、国立衛生試験所検査合格品）を混合し、適量の水を加えてふたたび短桿状に整形した後、60°C以下で乾燥して調製した。

1-2. 大腸菌および培養液

大腸菌 B 株 (*Escherichia coli* B strain) を用い、上記フロキシシを 100ppm になるように加えたグルコース添加ブイオン培地（肉エキス0.5%、ポリペプトン1%、塩化ナトリウム0.5%、グルコース1%）で 37°C、24時間培養した。

2. 大腸菌の抽出液の調製

大腸菌をフロキシシ 100ppm を含む培地で培養後、冷却下で遠心分離（6,000rpm, 15分間）によって菌体を集め、0.01M トリスー塩酸緩衝液（pH 7.5）にけん濁して、2回洗浄した。菌体に10倍容量のトリスー塩酸緩衝液（pH 7.5）を加え氷冷下で超音波処理（15Kc, 10分間）を行ない、次いでその処理液を遠心分離（10,000rpm, 15分間）して上澄液を得た。この上澄液には赤色色素（フロキシシ）が極くわずかではあるが含まれているので、セファデックス G-25 を用いてゲルろ過し色素を完全に除いた画分を抽出液としてその酵素活性を測定した。

3. 酵素活性測定法

3-1. カタラーゼ活性の測定

前報⁸⁾に記載したマウス肝カタラーゼ活性の測定法に従った。すなわち、0.01M 過酸化水素 0.5ml と 0.1M リン酸塩緩衝液（pH 6.8）2.0ml を含む混液に前記抽出液 1ml を添加し、氷水中で5分間反応させた。2N 硫酸 1ml を加えて反応を止め、遠心分離（0°C, 10,000rpm, 15分間）後の上澄液から 2ml をとって 0.005N 過マンガン酸カリウム溶液で滴定し、酵素液無添加の対照との差から分解された過酸化水素量を求め、抽出液 1ml 中に含まれるタンパク質量（mg）で除した値を酵素活性として示した。なおタンパク質含量は銅-Folin 法⁹⁾によって定量した。

3-2. DNase 活性の測定

子牛胸腺より調製した0.4% DNA 溶液 0.3ml, 0.1M 塩化マグネシウム 0.1ml, 1M トリスー塩酸緩衝液（pH 7.5）0.15ml, 脱イオン水0.20ml からなる混液を 37°C で5分間保温した後、これに大腸菌の抽出液 0.25ml を加えた。37°C で30分間反応させた後、carrier DNA（0.2%）溶

液 0.25ml, 1N 冷過塩素酸 1.0ml を加えて反応を停止させた。0°C で10分間放置し、遠心分離 (3,000rpm, 15分間) した後上澄液 1ml をとり、脱イオン水で 5ml に希釈した。続いてその希釈液の 260nm における吸光度を測定し、ブランクの吸光度との差を酵素活性とした。

3-3. RNase 活性の測定

RNase の反応液組成は 0.3M トリシュー塩酸緩衝液 (pH7.5) 0.2ml, 酵素液 0.25ml, 脱イオン水 0.3ml, 1.2%酵母 RNA 溶液 0.25ml で全容量は 1.0ml であった。反応条件は DNase の場合と同様であるが、反応の停止には0.75%酢酸ウラニウムを含む25%過塩素酸 0.2ml を用いた。

4. DNA の調製

マウス肝臓 DNA はと殺直後の肝臓より SDS 法¹⁰⁾によって、また大腸菌 DNA は集菌後直ちに Marmur 法¹¹⁾に準じて調製した。なおマウス肝臓 DNA は、いずれの実験も、フロキシシンを所定の濃度含む飼料で3ヶ月飼育した親 (P) のマウスより調製したものをを用いた。いずれも純度95%以上の高重合 DNA 標品であった。

5. DNA の塩基分析

DNA の塩基分析は Hershey らの塩酸分解法¹²⁾を用いた Uchida らの改良法¹³⁾によって行なった。

6. ショ糖密度勾配遠心法

0.1M 塩化ナトリウム-0.05M リン酸塩緩衝液 (pH7.0) を含む 5%および20%のショ糖溶液¹⁴⁾ 2.4ml ずつを用いて、5ml 容のニトロセルロースチューブに 5% から20%にいたる直線的なショ糖密度勾配液を作った。その上に流動パラフィンを重ねさせ、試料 0.2ml をさらにその上に静かにのせ、超遠心分離機 (日立, 55P-2 型, ローターSW-RP40A) で 30,000rpm, 4 時間遠心分離した。遠心分離後チューブの底に穴をあけ、内液を試験管に3滴ずつ分取し、それぞれに 1ml の水を加えて、分光光度計 (日立, 139型) でマイクロセル (光路 50mm) を使用して 260nm の吸光度を測定した。

沈降定数 $S_{0,w}^0$ は Burgi ら¹⁵⁾により提出された次式より求めた。

$$S_{0,w}^0 = \frac{6.45 \times 10^{10} D}{\omega^2 t}$$

D : チューブ表面からの距離 (cm)

w : 回転数 (rpm)

t : 回転時間

試料のマウス DNA は 260nm における吸光度が 0.80 (DNA として 40 μ g/ml) となるように¹⁶⁾ 希釈して超遠心分離に供した。

実験結果および考察

1. フロキシシン投与マウスの外観的所見

フロキシシン無添加飼料の対照群は正常な毛なみを示したが、フロキシシン添加飼料の試験群は全体的に体毛が抜けやすく、毛なみが荒れていた。この現象は親の代 (P) の1.0%フロキシシン区にとくにはっきり認められた。これらの中で一部のものは、下あごから胸にかけて皮膚がやぶれ、出血してたかれたような症状を示した。

また、歩行運動がぎこちなくなったものが親の代の1.0%区、第2世代目 (F₂) の0.5%区、2.0%区などに見られた。

肝臓採取のために解剖した際、皮下（乳腺上）に小円形（径 5mm 位）の肉腫様の固まりのあるものがあつた。このような症状は 2.0% 区の第 1 世代目 (F₁) の雌 1 匹、第 2 世代目 (F₂) の雌 3 匹に見られた。

2. 大腸菌の増殖度に及ぼすフロキシンの影響

フロキシンの大腸菌の増殖に及ぼす影響について検討するために、培養液の 660nm における吸光度を測定して増殖率を求めた。その結果は Table 1 のようであつた。

Table 1. Effect of phloxine on growth of *E. coli*.

	Growth	
	OD, 660 nm	Ratio (%)
Phloxine, 100 ppm	0.899	94.3
Control	0.953	100

E. coli was stationarily cultured in the medium containing glucose 1, peptone 1, meat extract 0.5, NaCl 0.5% and phloxine 100 ppm for 20 hrs at 37°C.

フロキシンの 100ppm 添加培地での大腸菌の増殖は対照区と比較してほとんど差はなく、この程度のフロキシンの濃度では大腸菌は外観上ほぼ正常な値にまで増殖することが示された。

3. フロキシンの添加培地で培養した大腸菌のカタラーゼ活性

フロキシンの添加培地で培養した大腸菌のカタラーゼ活性を測定して、フロキシンの菌体内カタラーゼに及ぼす影響を検討した。

Table 2. Effect of phloxine on catalase activity of *E. coli*.

	Catalase activity	
	Decomposed H ₂ O ₂ g/mg protein	Ratio (%)
Phloxine, 100 ppm	3.24×10^{-4}	47.0
Control	6.84×10^{-4}	100

Bacterium was cultured under the condition described in Table 1.

Table 2 に示したように、菌体内カタラーゼ活性は、フロキシンの添加培地のものはフロキシンの無添加のものにくらべると 47% となり著しく低い値を示した。マウスにフロキシンを投与した場合の肝臓カタラーゼの活性低下はすでに報告した⁸⁾が、大腸菌においても同様の現象が認められた。

過酸化水素のウイルス誘発能や突然変異誘起能は山藤らにより詳細に研究されており^{17,18)}、また担癌動物のカタラーゼ活性は強く阻害されていることも早くから知られている^{19,20,21)}。過酸化水素が生体内に蓄積されるのは主としてカタラーゼの活性が阻害されるためであると考えられるから、フロキシンの生体のカタラーゼ活性を阻害するという事は軽視できない現象であろう。

4. フロキシンの添加培地で培養した大腸菌の DNase および RNase 活性

フロキシンの大腸菌の核酸代謝に影響を与えるかどうかを調べるために、色素添加培地で培養した大腸菌の DNase と RNase 活性を検討した。それらの結果は Table 3 に示した。

Table 3. DNase and RNase activities in *E. coli* cultured in the medium containing phloxine.

	DNase activity		RNase activity	
	OD, 260 nm	Ratio (%)	OD, 260 nm	Ratio (%)
Phloxine, 100 ppm	0.490	274	0.243	48.0
Control	0.179	100	0.510	100

DNase 活性は試験区の方が強く、対照区のそれよりも 2.7 倍となり、DNA の分解が活発に起
こっているものと推定される。これに対し、RNase 活性は試験区の方が低く、対照区の約 50%
の活性しか示さなかった。この結果は DNase の場合とは全く逆の現象である。色素添加の大腸
菌では DNA および RNA の代謝異常が生じていたと考えられる。

5. 色素投与マウス肝臓 DNA および色素添加大腸菌 DNA に対する DNase の作用

フロキシシンが生体の DNA 代謝に何らかの影響を与えたとすれば、その DNA は物理化学的な
性質が変化し DNase に対する感受性が異なるはずである。それらのことを調べ、結果を Table
4 に示した。

Table 4. Action of DNase on DNAs treated with phloxine.

	Action of DNase	
	OD, 260 nm	Ratio (%)
Mouse liver DNA		
Phloxine, 1.0%	0.417	95.4
Phloxine, 2.0%	0.331	76.0
Control	0.437	100
<i>E. coli</i>		
Phloxine, 100 ppm	0.110	61.5
Control	0.179	100

マウスでは色素投与の肝 DNA（試験区）が DNase 作用を受けにくくなっており、フロキシ
シンの投与濃度が増加するにつれて被分解度が低下していた。大腸菌から抽出した DNA では、試
験区が対照区の 60% しか DNase 作用を受けないという結果がえられ、これはマウスの肝 DNA
と同じ傾向であった。

これらの結果から、フロキシシンが DNA の塩基と反応したのか、立体構造（二本鎖構造）に変
化を与えたのか、あるいは DNA の主鎖を切断して低分子化したのか、その他のことが考えられ
るが、そのいずれであるかは定かではない。しかし、色素の *in vivo* での処理（投与）が、DNA
の物理化学的性質に若干の変化を与えたことは明らかである。

6. マウス肝臓および大腸菌の塩基組成

フロキシシンが DNA の塩基にまで影響を及ぼすかどうかについて調べるために、フロキシシン投
与マウスの肝 DNA および色素添加培地で培養した大腸菌 DNA の塩基分析を行ない、それぞ
れの対照区の DNA の塩基と比較検討した。

Table 5. Base composition of DNA preparations treated with phloxine *in vivo*.

Preparation	Adenine	Guanine	Cytosine	Thymine
Mouse liver DNA				
Test, 2 %	29.4	21.3	19.4	29.9
Control	29.6	21.6	19.7	29.0
<i>E. coli</i> DNA				
Test, 100 ppm	23.1	26.6	26.7	23.6
Control	23.8	26.0	26.8	23.3

Table 5 から明らかなように、マウス肝臓も大腸菌もそれぞれ対照区と試験区の DNA の塩基

組成には差異が見られなかった。このことは、フロキシンは DNA の塩基そのものの変換というような作用はしていないことを示している。

7. マウス肝臓 DNA のシヨ糖密度勾配遠心

フロキシンの投与のマウス肝 DNA が正常か、あるいは物理化学的变化を受けているかを調べるために、DNA のシヨ糖密度勾配遠心を行ない、DNA の各成分の比較を行なった。シヨ糖密度勾配遠心図を Fig. 1 に示した。

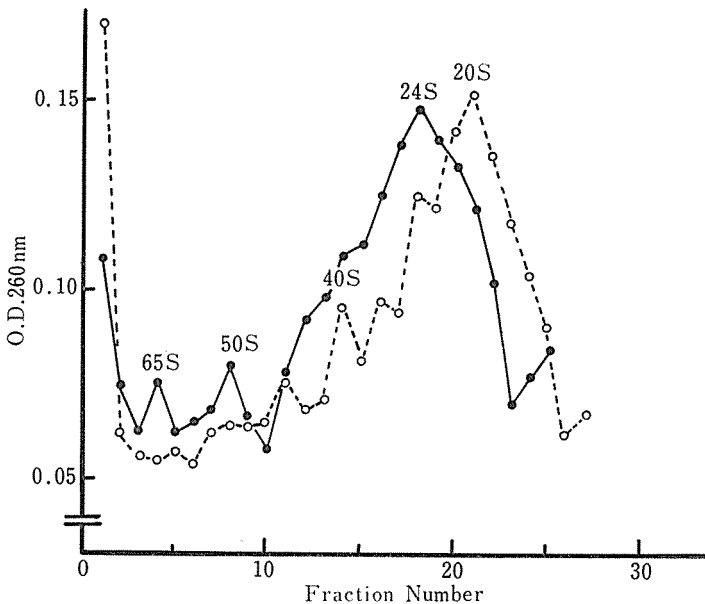


Fig. 1. Sedimentation patterns of liver DNA from phloxine-fed mouse and normal one.

DNA solution was subjected to sedimentation analysis through 5 to 20% sucrose gradient containing 0.1 M sodium chloride-0.05 M phosphate buffer, pH 7.0, for 4 hrs at 30,000 rpm at 10 °C.

●—● Control, ○---○ 2.0% phloxine administration

対照区のマウス肝 DNA の沈降定数は 24S が主体をなしているが、65S, 50S と大きい値の成分のものも含んでいた。試験区の DNA の沈降定数は対照区のような大きい成分 (65S, 50S) はなく、20S の小さい値の成分が主体であった。

沈降定数が大きければ分子量は大きく、したがって上記の結果は DNA の大きな分子がフロキシンの投与によって低分子化したと考えられ、生体内で DNA 分子の切断すなわち染色体の切断がこの色素によって誘起されたと推定される。これはウイルス誘発剤ならびに発癌剤が DNA を切断するという内田ら^{16,22)}の報告とも類似した結果である。このようにフロキシンは DNA 切断能を有し、また大腸菌に対して突然変異誘起性を示すことが賀田ら²³⁾によって証明されており、これらの事実からフロキシンの安全性についてはとくに注意を払うべきであると考えられる。

摘 要

フロキシンをマウスおよび大腸菌に投与して、マウスの外観、大腸菌の 2, 3 の酵素活性、お

よびマウス、大腸菌の DNA に及ぼす影響を検討した。

1. フロキシシンを投与されたマウスは粗毛、脱毛症状、皮膚の炎症などが見られ、歩行運動も異常で、明らかに対照区との間に差異が認められた。
2. フロキシシン添加培地で培養した大腸菌のカタラーゼ活性は著しく低い値を示した。
3. フロキシシン添加培地で培養した大腸菌の DNase 活性は対照区よりも著しく高く、逆に RNase 活性は低い値を示し、色素添加の大腸菌では核酸代謝に異常が生じていた。
4. フロキシシンは *in vivo* で DNA の物理化学的性質に若干の変化を与え、色素投与の供試生物の DNA は DNase に対する感受性が対照の DNA と異なっていた。
5. 供試生物の DNA の塩基組成は色素投与の有無にかかわらず、その間には差異が見られず、フロキシシンは DNA の塩基それ自体には影響を与えなかった。
6. フロキシシン投与のマウス肝 DNA のショ糖密度勾配遠心図は、色素無投与の DNA に見られたような沈降定数の大きい値の成分はなく小さい値の成分が主体であった。

引用文献

- 1) 榎本則行, 園田博正: 佐賀大農彙, **27**, 55 (1969).
- 2) 榎本則行, 井上芳昌, 内田 泰: 佐賀大農彙, **29**, 9 (1970).
- 3) 内田 泰, 楠本忠夫, 榎本則行: 日農化大会講演要旨集, p. 235 (1969).
- 4) 榎本則行, 内田 泰: シンポジウム「食品と公害」福岡市, p. 24 (1970).
- 5) 稲田邦子, 宮沢文雄: 食衛誌, **10**, 344 (1969).
- 6) 村上浩紀, 坂田幸平, 波多野昌二, 渡辺忠雄: 食衛誌, **13**, 12 (1972).
- 7) 村上浩紀, 坂田幸平, 波多野昌二, 渡辺忠雄: 食衛誌, **13**, 19 (1972).
- 8) 榎本則行, 田口継喜, 内田 泰: 佐賀大農彙, **33**, 27 (1972).
- 9) 赤堀四郎編: 酵素研究法 (第1巻), 朝倉書店, 東京, 1961, p. 166.
- 10) E. R. M. Kay, N. S. Simmons and A. L. Dounce: J. Am. Chem. Soc., **74**, 1724 (1953).
- 11) J. Marmur: J. Mol. Biol. **3**, 208 (1961).
- 12) A. D. Hershey, J. Dixon and M. Stacey: J. Gen. Microbiol., **14**, 160 (1956).
- 13) Y. Uchida, H. Shigematu and K. Yamafuji: Enzymol., **29**, 369 (1965).
- 14) R. J. Britten and R. B. Roberts: Science, **131**, 32 (1960).
- 15) E. Burgi and A. D. Hershey: Biophys. J., **3**, 309 (1963).
- 16) 内田 泰: 九大農学部農産製造学 (食糧化学) 研究室報告, 第5号, 1967, p. 16.
- 17) K. Yamafuji: Enzymol., **27**, 217 (1964).
- 18) K. Yamafuji: Nutritional Factor in Virus Formation, Crosby Lockwood & Son Ltd., London, 1964, p. 70.
- 19) V. E. Price and R. E. Greenfield: J. Biol. Chem., **209**, 363 (1954).
- 20) H. V. Euler and L. Heller: Z. Krebsforsch., **56**, 393 (1949).
- 21) F. Fukuoka and W. Nakahara: Gann, **42**, 55 (1951).
- 22) K. Yamafuji and Y. Uchida: Enzymol., **35**, 131 (1968).
- 23) T. Kada, K. Tutikawa and Y. Sadaie: Mutation Research, **16**, 165 (1972).